

## VARIACIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE ALCALOIDES FÚNGICOS EN *Festuca rubra* DEL NORTE Y SUR DE EUROPA

B.R. VÁZQUEZ DE ALDANA<sup>1</sup>, M. HELANDER<sup>2</sup>, K. SAIKKONEN<sup>3</sup>, A. ALVAREZ-PASCUA<sup>1</sup> Y E.I. ZABALGOGEAZCOA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>IRNASA-CSIC, 37008 Salamanca, España. [beatriz.dealdana@irnasa.csic.es](mailto:beatriz.dealdana@irnasa.csic.es). <sup>2</sup>Section of Ecology, Department of Biology, University of Turku, 20014 Turku, Finland. <sup>3</sup>Natural Resources Institute Finland (LUKE), Finland.

### RESUMEN

Los hongos endófitos del género *Epichloë* infectan de forma asintomática varias especies de gramíneas. Las plantas de *Festuca rubra* infectadas por *Epichloë festucae* pueden contener dos tipos de alcaloides, uno tóxico para el ganado (ergovalina) y otro tóxico para insectos (peramina). En este trabajo se estudia el efecto de la procedencia de la planta y de las condiciones de crecimiento (parcela) en el contenido de alcaloides en plantas de *F. rubra* procedentes de pastos del sur (España) y del norte de Europa (Islas Faroe y Finlandia), en un ensayo experimental de campo llevado a cabo de forma simultánea en tres parcelas experimentales localizadas en España (Salamanca) y en Finlandia (Ruissalo y Kevo). El alcaloide peramina se detectó en un 53% de las plantas procedentes de España, pero en las plantas procedentes del norte de Europa (Islas Faroe o Finlandia) no se detectó. El alcaloide ergovalina se detectó en plantas de las tres procedencias y en las tres parcelas experimentales. La mayor concentración de ergovalina se encontró en las plantas de Finlandia y respecto a la parcela experimental, la mayor concentración se encontró en ambas parcelas de Finlandia, que fueron significativamente superiores a la de la parcela de España.

**Palabras clave:** gramíneas, peramina, ergovalina, variabilidad geográfica, *Epichloë*.

### INTRODUCCIÓN

*Festuca rubra* L. es una gramínea perenne frecuente en pastos y adaptada a diferentes condiciones ambientales. Los órganos aéreos de esta gramínea son infectados sistémicamente por el hongo endófito *Epichloë festucae*, que se transmite eficientemente por semilla. Así, se han encontrado plantas de *F. rubra* infectadas en pastos de toda Europa, desde pastos españoles en la dehesa salmantina (Zabalgogeoazcoa *et al.*, 1999) a diversos hábitats en los países nórdicos (Wäli *et al.*, 2007).

Las asociaciones entre endófitos *Epichloë* y gramíneas son de tipo mutualista, debido principalmente a que el hongo no causa síntomas visibles, pero produce varios tipos de alcaloides tóxicos para herbívoros que protegen a la planta huésped (Bush *et al.*, 1997). Las plantas de *F. rubra* infectadas por *Epichloë* pueden contener dos tipos de alcaloides, uno tóxico para el ganado (ergovalina) y otro tóxico para insectos (peramina). La concentración de estos alcaloides en la planta depende del genotipo del hongo y de la planta, así como de las condiciones ambientales (Schardl *et al.*, 2013). Actualmente existen endófitos que se utilizan en la mejora de gramíneas, siendo de especial interés para la mejora de variedades forrajeras aquellas cepas que no producen alcaloides tóxicos para el ganado.

En este trabajo se estudia el efecto de la procedencia de la planta y de las condiciones ambientales de crecimiento en el contenido de alcaloides en plantas de *F. rubra* infectadas por *Epichloë*. Para ello se consideraron plantas procedentes de pastos del sur (España) y del norte de

Europa (Islas Faroe y Finlandia), en un ensayo experimental de campo llevado a cabo de forma simultánea en España (Salamanca) y en Finlandia.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo de plantas de *F. rubra* en pastos de España, Islas Faroe y Finlandia. El muestreo en España se realizó en pastos de dehesa en la provincia de Salamanca (40°58'N, 6°7'O; 40°58'N, 5°57'O; 40°21'N 5°49'N). En las Islas Faroe, se muestreó una pradera (61°59'N, 6°48'O). En Finlandia se muestrearon dos puntos: una pradera a la orilla del mar en la zona más meridional (Ruissalo; 59°50'N, 23°13'E) y una rivera en la zona más septentrional del país (Utsjoki, Laponia; 69° 55' N, 27° 2' E). En cada una de las cuatro localidades, se recogieron un total de 90 plantas de *F. rubra* en tres zonas distantes un mínimo de 20 km (30 plantas en cada zona). Las plantas se llevaron al laboratorio y se verificó la presencia del hongo endofítico *Epichloë festucae* por microscopía y mediante su aislamiento directo de trozos de tallo en agar de patata y dextrosa (Bacon y White, 1994).

Todas las plantas recogidas (155 plantas infectadas por *Epichloë* (E+) y 205 plantas no infectadas (E-) se dividieron vegetativamente en clones y se trasplantaron a semilleros con una mezcla de turba y perlita (2:1), de forma que se pudieran tener tres copias completas de toda la colección de plantas (360) para trasplantar en tres parcelas geográficamente diferentes. En octubre de 2012, se realizó el trasplante del total de 360 plantas en tres parcelas experimentales: España (Salamanca, finca experimental Muñovela), sur de Finlandia (Ruissalo) y norte de Finlandia (Kevo). Cada una de las parcelas contenía un total de 360 plantas, con el mismo diseño de distribución al azar y distancia entre las plantas. Las plantas se regaron durante el primer mes de establecimiento, pero no posteriormente. En junio de 2013, se cortó la biomasa aérea de todas las plantas en cada una de las parcelas, y las muestras se liofilizaron para posterior análisis químico.

Se seleccionaron 50 plantas E+, de forma que de cada una hubiera una cantidad de materia seca suficiente en las muestras recogidas en las tres parcelas experimentales para llevar a cabo el análisis químico de alcaloides. Hay que señalar que en la parcela del norte de Finlandia el crecimiento de las plantas es menor en comparación a la parcela de España. Así que las plantas E+ seleccionadas fueron: 14 plantas procedentes de Faroe, 21 plantas de Finlandia, 15 plantas de España. Las plantas no infectadas seleccionadas procedían de Faroe (4), Finlandia (7) y España (4). En la mayor parte de los casos se pudieron analizar muestras de estas plantas de las tres parcelas.

Para el análisis de peramina se siguió el método descrito por Barker *et al.* (1993). Se realizó una extracción de 100 mg de muestra vegetal (seca y molida) con 3 ml de isopropanol al 30% a 90 °C durante 30 minutos. El extracto se pasó a través de un cartucho CBA (ácido carboxílico 100 mg, Varian Bond Elut), eluyéndose con 1 ml de ácido fórmico al 5%. La cuantificación se realizó por HPLC con una columna C18 3,9 mm x 150 mm; 4 µm (Nova Pack, Waters) con un detector PDA (matriz de fotodiodos) Waters 2996, a  $\lambda=280$  nm. La fase móvil fue isocrática compuesta de acetonitrilo al 18% en tampón de ácido fórmico en carbonato de guanidina (10 mM) con un flujo de 0,7 ml min<sup>-1</sup>.

El análisis de ergovalina se realizó según el procedimiento descrito por Yue *et al.* (2000). Se realizó una extracción de 500 mg de planta en 10 ml de cloroformo y 0,5 ml de hidróxido de sodio 5 mM. El extracto fue filtrado y lavado con 3,0 ml de cloroformo, y posteriormente purificado con columnas de gel de sílice HL (Ergosil, Analtech) preconditionadas con 5,0 ml de cloroformo. Se eliminaron los pigmentos con 5,0 ml de cloroformo: acetona (75:25 v/v), y el residuo se eluyó con 3,0 ml de metanol. La cuantificación de ergovalina se realizó por HPLC con un módulo Waters 2596, una columna de C18 150 mm x 4,6 mm; 2,7 µm (Agilent Poroshell) y un detector de fluorescencia

(Waters 4570) con  $\lambda_{exc}=250$  nm;  $\lambda_{em}=420$  nm. La fase móvil fue acetonitrilo con acetato amónico 0,01M y flujo de 0,8 ml min<sup>-1</sup>.

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un ANOVA de dos vías considerando los factores 'procedencia de la planta' y 'parcela experimental'.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de plantas infectadas por *Epichloë* fue de 40-80% en España, 4-71% en Islas Faroe, 0% en el sur Finlandia y 52-68% en el norte de Finlandia. La incidencia de *Epichloë* en gramíneas silvestres es variable y se desconoce a qué factores concretos se debe, pero las altas frecuencias encontradas sugieren que en las condiciones ambientales en esas localidades el endófito puede proporcionar beneficios selectivos a la planta huésped (Clay y Holah, 1999; Wali *et al.*, 2007).

El alcaloide peramina se detectó en un 53% de las plantas procedentes de España, pero en las plantas procedentes del norte de Europa (Islas Faroe o Finlandia) no se detectó dicho alcaloide en ninguna de las tres parcelas. En la mayoría de los casos, las plantas de España que producen peramina lo hicieron en las tres parcelas experimentales donde crecieron (Salamanca, Ruissalo y Kevo), y las concentraciones fueron similares en dichas parcelas (Tabla 1).

**Tabla 1. Concentración del alcaloide peramina en plantas españolas de *Festuca rubra* infectadas por *Epichloë* creciendo en tres parcelas experimentales, Salamanca (España), Ruissalo (Finlandia sur) y Kevo (Finlandia norte).**

Procedencia de la planta	Código planta	Peramina (mg/kg)		
		Parcela experimental		
		Salamanca	Ruissalo	Kevo
SP	GD31	2,09	2,51	2,27
SP	LV3	3,79	0	NA
SP	LV6	2,12	2,02	0
SP	LV8	4,38	1,63	0
SP	LV18	3,02	3,47	NA
SP	POR3	2,12	2,68	1,47
SP	POR4	2,15	2,10	2,2
SP	POR12	3,15	2,21	2,55
SP	POR14	0	0	2,48
	MEDIA	2,85	2,37	2,19

NA = no se analizó la muestra por no haber suficiente cantidad.

El alcaloide ergovalina se detectó en plantas procedentes de los tres sitios (España, Islas Faroe y norte de Finlandia) y en las tres parcelas experimentales (Tabla 2). Considerando la procedencia de la planta, un 73,8% de las plantas procedentes de Finlandia produjeron ergovalina, así como el 23,1% de las procedentes de Islas Faroe y el 19,5% de las procedentes de España. Considerando las parcelas experimentales, estos porcentajes fueron del 60,9% de las plantas de Ruissalo, 44,4% de las de Kevo y 28,0% de las de Salamanca. Las plantas procedentes de Islas Faroe no produjeron ergovalina en la parcela de Salamanca, pero sí en el resto de las parcelas, y las plantas procedentes de España no produjeron ergovalina en la parcela de Kevo (norte de Finlandia) pero sí en el resto (Tabla 2).



**Tabla 2. Porcentaje de plantas que producen ergovalina y concentración media ( $\mu\text{g/kg}$ ) en plantas de *Festuca rubra* infectadas por *Epichloë festucae* de distinta procedencia (España, norte de Finlandia e Islas Faroe) creciendo en parcelas experimentales de España (Salamanca) y Finlandia (Ruissalo y Kevo). Entre paréntesis se indica número de plantas en las que se detectó el alcaloide y el total analizado.**

Procedencia de la planta	Parcela experimental										TOTAL
	Salamanca			Ruissalo			Kevo				
	%	µg/kg	SE	%	µg/kg	SE	%	µg/kg	SE	%	
España	6,7(1/15)	5,47	5,47	50,0(7/14)	149,8	56,2	0(0/12)	0		19,5(8/41)	62,3
Finlandia	61,9(13/21)	146,3	33,6	76,2(16/21)	292,0	68,2	84,2(16/19)	292,7	41,1	73,8(45/61)	242,1
Islas Faroe	0(0/14)	0	0	45,5(5/11)	117,1	55,9	27,2(4/14)	83,4	52,8	23,1(9/39)	63,0
Total/Media	28,0	64,4		60,9	207,2		44,4	179,6			

Analizando los datos de concentración de ergovalina, se encontró un efecto significativo de la procedencia de la planta ( $gl=2$ ;  $F=15,3$ ;  $P<0,0001$ ) y de la parcela experimental ( $gl=2$ ;  $F=5,99$ ;  $P=0,003$ ), pero la interacción entre ambos factores no fue significativa ( $gl=4$ ;  $F=0,612$ ;  $P=0,655$ ). La mayor concentración de ergovalina se encontró en las plantas procedentes de Finlandia, no habiendo diferencias significativas entre las procedentes de España e Islas Faroe. Respecto a la parcela experimental, la mayor concentración se encontró en ambas parcelas de Finlandia ( $207,2 \mu\text{g/kg}$  y  $179,6 \mu\text{g/kg}$  en las parcelas de Ruissalo y Kevo, respectivamente), que fueron significativamente superiores a la de la parcela de España (Tabla 2).

Si consideramos los dos alcaloides en el conjunto en las plantas procedentes de España (que son las únicas que producen peramina), creciendo en las tres parcelas experimentales, un 20% de las plantas contienen los dos alcaloides en alguna de las tres parcelas, un 33% solo contienen peramina, un 27% solo contienen ergovalina y un 20% ninguno de los alcaloides. Estas plantas que producen peramina, con actividad insecticida, pero no ergovalina, tóxico para ganado, pueden tener interés para su uso como forrajeras.

Los resultados obtenidos sugieren que la concentración de peramina es menos variable que la de ergovalina. La concentración de ergovalina parece ser más dependiente de factores ambientales, ya que una misma planta varía en la concentración de dicho alcaloide dependiendo de la parcela experimental, y por tanto las condiciones ambientales. Sin embargo, la concentración de peramina en las plantas no tiene grandes variaciones entre parcelas experimentales, y parece ser más dependiente del genotipo de la planta o del hongo. Así por ejemplo solo se detectó peramina en las plantas procedentes de España. Resultados similares se encontraron en estudios realizados con *Festuca rubra* de dehesas de la provincia de Salamanca (Vázquez de Aldana *et al.*, 2010).

Resulta curioso que la concentración de ergovalina tienda a incrementar en la parcela de Ruissalo. En ninguna de las localidades de muestreo hay una elevada presión de pastoreo, que pudiera inducir a elevados niveles de este alcaloide como protección contra ganado (Bony y Delatour, 2001). Esto también podría indicar que este alcaloide tiene otras funciones además de la protección contra herbívoros (Bush *et al.*, 1997; Panaccione *et al.*, 2014). Hay trabajos que indican que la concentración de alcaloides fúngicos aumenta en condiciones de estrés ambiental, como por ejemplo la sequía (Hahn *et al.*, 2008). Esto sugiere que las condiciones ambientales de la parcela de Ruissalo puedan ser más estresantes para las plantas. Hay una importante diferencia en las horas de luz entre las parcelas y en la duración del período de crecimiento. Así en la temporada de crecimiento de las plantas, el día en Ruissalo es más largo que en Salamanca, y en Kevo apenas hay

noche. Por otro lado, el periodo de crecimiento en Finlandia es más corto que en España. Estas diferencias podrían inducir a una mayor concentración de alcaloides en las plantas de las parcelas de Finlandia.

En la mayor parte de los casos, la concentración de ergovalina se encontró por debajo del nivel considerado como crítico en la dieta (400 µg/kg), por encima del cual se pueden observar síntomas clínicos de toxicidad en ganado vacuno (Zabalgogezcoa y Bony, 2008). Un 9% de las plantas produjo concentraciones por encima de este nivel en alguna de las parcelas experimentales, la mayoría de los casos corresponden a plantas procedentes de Finlandia creciendo en las parcelas de Finlandia.

## CONCLUSIONES

Las plantas de *Festuca rubra* infectadas por *Epichloë* tienen concentraciones de alcaloides fúngicos que varían con la procedencia de la planta y las condiciones de crecimiento entre el norte y sur de Europa. La concentración de peramina, insecticida, parece más dependiente de la procedencia de la planta. La concentración de ergovalina, tóxico para mamíferos, puede estar más relacionada con los factores ambientales ya que su concentración en la planta varía con la parcela experimental.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de colaboración ha sido financiado con el proyecto International Network for Terrestrial Research and Monitoring in the Arctic (INTERACT), el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (proyecto AGL2011-22783) y Academy of Finland (proyecto 137909).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACON C.W. Y WHITE J.F. (1994) Stains, media and procedures for analyzing endophytes. En: Bacon C.W. y White J.F. (Eds) *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*, pp. 47-56. Boca Raton, FL: CRC Press.
- BARKER D.J., DAVIES E., LANE G.A., LATCH G.C.M., NOTT H.M. Y TAPPER B.A. (1993) Effect of water deficit on alkaloid concentrations in perennial ryegrass endophyte associations. En: Hume D.E. et al. (Eds) *Proceedings of the Second International Symposium on Acremonium/Grass Interactions*, pp. 67-71. Palmerston North, New Zealand: AgResearch.
- BONY S. Y DELATOUR P. (2001) Relevance and impact of grass endophyte toxins in Europe. En: Paul V.H.Y. y Dapprich P.D. (Eds) *The Grassland Conference 2000 Soest*, pp. 207-218. Soest, Germany: Paderborn University.
- BUSH L.P., WILKINSON H.H. Y SCHARDL C.L. (1997) Bioprotective alkaloids of grass-fungal endophyte symbioses. *Plant Physiology*, **114**, 1-7.
- CLAY K. Y HOLAH J. (1999) Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*, **285**, 1742-1744.
- HAHN H., MCMANUS M.T., WARNSTORFF K. Y SCOTT B. (2008) *Neotyphodium* fungal endophytes confer physiological protection to perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) subjected to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, **63**, 183-199.
- PANACCIONE D.G., BEAULIEU W.T. Y COOK D. (2014) Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. *Functional Ecology*, **28**, 299-314.
- SCHARDL C.L., FLOREA S., PAN J., NAGABHYRU P., BEC S. Y CALIE P.J. (2013) The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**, 480-488.

- VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., ZABALGOGEAZCOA I., RUBIO DE CASAS R., GARCÍA-CIUDAD A. Y GARCÍA-CRIADO B. (2010) Relationships between the genetic distance of *Epichloë festucae* isolates and the ergovaline and peramine contents of their *Festuca rubra* hosts. *Annals of Applied Biology*, **156**, 51-61.
- WÄLI P.R., AHLHOLM J.U., HELANDER M. Y SAIKKONEN K. (2007) Occurrence and genetic structure of the systemic grass endophyte *Epichloë festucae* in fine fescue populations. *Microbial Ecology*, **53**, 20-29.
- YUE Q., JOHNSON CICALSE J., GIANFAGNA T.J. Y MEYER W.A. (2000) Alkaloid production and chinch bug resistance in endophyte-inoculated chewings and strong creeping red fescues. *Journal of Chemical Ecology*, **26**, 279-292.
- ZABALGOGEAZCOA I., VÁZQUEZ DE ALDANA B.R., GARCÍA CRIADO B. Y GARCÍA CIUDAD A. (1999) The infection of *Festuca rubra* by the fungal endophyte *Epichloë festucae* in Mediterranean permanent grasslands. *Grass and Forage Science*, **54**, 91-95.
- ZABALGOGEAZCOA I. Y BONY S. (2008) Neotyphodium research and application in Europe. En: Roberts C.A. *et al.* (Eds) *Neotyphodium in Cool-Season Grasses*, pp. 23-33. Iowa, USA: Blackwell Publishing.

## VARIATION OF FUNGAL ALKALOID CONTENTS IN *Festuca rubra* FROM NORTH AND SOUTH EUROPE

### SUMMARY

Several pasture grasses are commonly infected by *Epichloë* fungal endophytes. *Festuca rubra* plants infected by *Epichloë festucae* may have two types of alkaloids, one toxic to livestock (ergovaline) and other toxic to insects (peramine). In this study, the effect of plant origin and environmental growth conditions on the concentration of alkaloids in plants of *F. rubra* from south (Spain) and northern Europe (Faroe islands and Finland) pastures was studied in an experimental field trial conducted simultaneously in three experimental plots located in Spain (Salamanca) and Finland (Ruissalo and Kevo). The peramine alkaloid was detected in 53% of the plants from Spain, but was not detected in any plot from northern Europe (Faroe Islands or Finland) was not detected in any plot. Ergovaline was detected in plants from the three sites and the three experimental plots. The highest ergovaline concentration was found in plants from Finland. Comparing experimental plots, the highest ergovaline content was found in both plots from Finland which were significantly higher than that of the Spanish plot.

**Key words:** grasses, peramine, ergovaline, geographical variability, *Epichloë*.